

体内外方法快速筛选系列候选化合物的药动学性质

董晓娜^{1,2}, 朱晓霞¹, 孟志云¹, 刘江林^{1,2}, 曹颖林², 窦桂芳^{1*}

(1. 军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

关键词: 快速筛选; 代谢稳定性; 生物利用度; LC-MS/MS

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 11-1309-04

Rapid pharmacokinetics screening of drug candidates *in vitro* and *in vivo*

DONG Xiao-na^{1,2}, ZHU Xiao-xia¹, MENG Zhi-yun¹, LIU Jiang-lin^{1,2}, CAO Ying-lin², DOU Gui-fang^{1*}

(1. Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: The paper is to report the pharmacokinetic character of a series of chemical compounds *in vitro* and *in vivo*. Metabolism stability of a series of chemical compounds was screened by using rat liver microsomes. The samples of different chemical compounds were combined and then simultaneously detected by LC-MS/MS. Compounds y13, y12 and y11 were screened out by microstability assay *in vitro*. The pharmacokinetics of compounds y11, y12 and y13 was evaluated by using SD rat. The plasma samples were pooled at the same time. The plasma concentrations were determined by LC-MS/MS. The pharmacokinetic character of two compounds y13, y11 was good by screening *in vivo*, so they were developed for further research. High-throughput screening of drug candidates *in vitro* and *in vivo* was effective, to provide information for the chemical structure information and lower the drug development risk.

Key words: rapid screening; metabolism stability; absolute bioavailability; LC-MS/MS

天然药物分离提取技术和组合化学等技术的发展, 大大加快了候选药物的发现速度, 每年都有成千上万的新化合物需要进行筛选。药代动力学是药物筛选中至关重要的一个环节, 统计数据表明, 在药物开发阶段, 大约有 39% 的候选化合物由于药代动力学方面的原因被淘汰^[1], 随着体内外筛选技术的发展已经下降到 10%^[2]。因此, 在新药开发的早期阶段, 需要利用各种体内和体外模型对候选化合物药动学特点进行初筛, 以便在研究开发的早期确定该候选化合物是否有继续开发的价值, 根据筛选的结果对先导化合物进行结构改造或修饰, 获得具有良好药动学特性的候选化合物。本实验从体外和体内两方面对化学结

构相似的系列抗肿瘤化合物的药动学性质进行初筛, 体外采用代谢模型进行筛选, 通过体外代谢稳定性筛选的结果, 结合化合物的药效活性, 选择半衰期合理、清除率低的化合物进行体内筛选, 采用等时间点样品混合的方法进行分析, 加快了化合物的筛选。

材料与方法

药品与试剂 化合物 x01-x07, y08-y13、内标 (epothilone B) 由军事医学科学院提供。CYP450 亚型的典型底物: 非那西丁 (phenacetin), 双氯酚酸 (diclofenac), 奥美拉唑 (omeprazole), 右美沙芬 (dextromethorphan), 睾酮 (testosterone) 均购自美国 Sigma 公司, 还原型辅酶 II (NADPH) (美国 Roch 进口分装, 纯度>97%), 其他试剂均为国产分析纯化学试剂。

收稿日期: 2009-05-21.

基金项目: 国际科技合作重点项目计划资助项目 (2005DFA30080).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-66932951, E-mail: douguifang@vip.163.com

仪器 高速离心机 (Avanti™ J-301) (美国 Beckman); 96 孔板 (2 mL/孔) (美国 Corning Costar), 水浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); Finnigan TSQ Quantum 三级四极杆质谱仪、Finnigan Surveyor 自动进样器和 MS 泵、Xcalibur 2.0 数据处理系统 (美国 Thermo Electron)。

动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雌雄各半, 体重 (200 ± 20) g, 购自军事医学科学院实验动物中心, 合格证号: SCXK (军) 2007-004, 清洁级。

测定肝微粒体中化合物 x01-y13 及典型底物的 LC-MS/MS 条件 根据化合物的分子量, 离子碎片, 保留时间将其分成两组进行测定。色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (150 mm × 2.1 mm, 5 μm)。流动相 A 为甲醇-甲酸 (100 : 0.1), 流动相 B 为水-甲酸 (100 : 0.1), 梯度洗脱方法为 0~1 min, A% (10%), 1~1.5 min, A% (10%~90%), 1.5~5.5 min, A% (90%), 5.5~6 min, A% (90%~10%), 6~7 min, A% (10%)。流速为 0.2 mL·min⁻¹, 进样量为 10 μL, 在室温条件下分析。选用电喷雾离子化方式 (electrospray ionization, ESI), 进行正离子 (positive) 多反应监测 (multi-reaction monitoring, MRM), 喷雾电压 4.8 kV; 两个化合物组、典型底物组的鞘气流速分别为 21、21 和 35 流量单位; 辅气流速分别为 2、16 和 5 流量单位; 毛细管加热温度: 300 °C; 采用选择反应监测 (SRM) 方式进行检测。

代谢稳定性筛选

肝微粒体制备 SD 大鼠雌雄各半, 大鼠禁食不禁水 12 h 后, 脱颈椎处死, 立即剖取完整的肝脏组织, 用超速离心法^[3]制备 SD 大鼠混合肝微粒体, 采用 Lowry 法^[4]测定肝微粒体蛋白含量, 用参与药物代谢的 5 个主要 CYP 亚型 CYP1A2、CYP2D6、CYP2C19、CYP2C9、CYP3A2 的典型底物来检测微粒体亚型酶的活性。

溶液配制 50 mmol·L⁻¹ K₂HPO₄ 缓冲液: 精密称定 K₂HPO₄ 粉末 0.87 g, 加入三蒸水 100 mL 使之完全溶解, 用磷酸调至 pH 7.4, 4 °C 冷藏。

NADPH 再生系统: 精密称取 NADPH 0.045 3 g, 用 K₂HPO₄ 缓冲液 10.9 mL 溶解完全, 即得 5 mmol·L⁻¹ NADPH 再生系统溶液, 该溶液采取临用新鲜配制的方法。

阳性对照底物混合液: 分别取浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 5 种典型底物, 混合后用 K₂HPO₄ 缓冲液稀释至 4 μmol·L⁻¹, 该溶液采取临用新鲜配制的方法。

待测化合物: 取 1 mmol·L⁻¹ 各待测化合物储备液用 K₂HPO₄ 缓冲液稀释至 4 μmol·L⁻¹, 该溶液采取临用新鲜配制的方法。

终止液: 用乙腈配制 2 μmol·L⁻¹ 内标, 4 °C 冷藏。

肝微粒体孵育 孵育体系为 200 μL, 其中 SD 大鼠肝微粒体 0.5 mg·mL⁻¹, 阳性对照底物/化合物 2 μmol·L⁻¹, MgCl₂ 5 mmol·L⁻¹, NADPH 1.25 mmol·L⁻¹, 用 2 mL/孔的 96 孔板进行反应。依次添加缓冲液、MgCl₂、化合物和微粒体 (在一块 96 孔板内每个化合物及典型底物分别平行做 10 份样品), 37 °C 预孵 5 min 后, 加入 NADPH 启动反应, 继续孵育, 分别在 0、10、20、40 和 60 min 用终止液终止反应, 每个时间点做复孔, 反应终止后 96 孔板于 3 850×g 离心 20 min, 分别吸取化合物 y11、y12、x02、x01、y08、y09 的上清液 200 μL 转移至另一个 96 孔板混合后移至 1.5 mL EP 管中, 同法混合化合物 y13、y10、x06、x03、x05、x07、x04, 阳性对照组单独吸出, 14 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清液, LC-MS/MS 检测每一化合物及阳性对照的剩余量。

数据处理 采用一点法定量, 以反应开始前的浓度为定量标准。消除速率常数 (k_e) 为自然对数-浓度曲线上 0 和 10 min 或 20 min 两点间直线的斜率, 消除半衰期 $t_{1/2} = 0.693/k_e$, 然后按关系式 $CL_{int} = 693/t_{1/2} \times C_{protein}^{[5]}$ 计算出固有清除率 $CL_{int}^{[5]}$ 。

化合物 y11、y12、y13 体内药动学筛选

给药方案与血样采集 雄性 SD 大鼠 18 只, 体重 180~220 g, 随机均分为 3 组, 组内又分为灌胃给药组与尾静脉给药组两组, 实验前禁食 12 h, 给药 4 h 后允许大鼠自由进食。每组分别给予化合物 y11、y12 和 y13, 剂量均为灌胃 10 mg·kg⁻¹, 静脉注射 10 mg·kg⁻¹。于给药前及给药后 0.02、0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12 和 24 h 从眼眶静脉丛取全血约 0.5 mL, 置肝素抗凝管中, 分离血浆, 在 -20 °C 保存。

血浆样品处理 取不同化合物相同时间点的待测大鼠血浆样品 100 μL 进行混合, 加入含有 100 ng·mL⁻¹ 内标的乙腈溶液 450 μL, 涡旋振荡 3 min, 14 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液 100 μL 进样 10 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

数据处理 血药浓度数据用 WinNolin5.2.1 计算, 采用非房室分析, 获得各项药代动力学参数, 利用线性梯形法则 (与线性外推) 计算曲线下面积。

结果

1 色谱图

一组化合物及主要 CYP 亚型典型底物合并检测的色谱图见图 1。

2 大鼠肝微粒体的亚型酶活性检测

用参与药物代谢的 5 个主要 CYP450 亚型的典型底物来检验微粒体亚型酶的活性, 见表 1, 与 0 min 时 5 个典型底物的浓度相比, 它们在 10、20、40 和

60 min 的浓度均有减少, 且呈递减的趋势, 表明 5 个底物在大鼠肝微粒体中均有代谢, 说明微粒体的亚型酶具有活性。

3 待测化合物在 SD 大鼠肝微粒体中的消除

待测化合物与 SD 大鼠肝微粒体孵育后其代谢稳定性结果见表 2。

4 大鼠体内的药代动力学

4.1 大鼠体内的药时曲线 化合物 y13 的平均血药

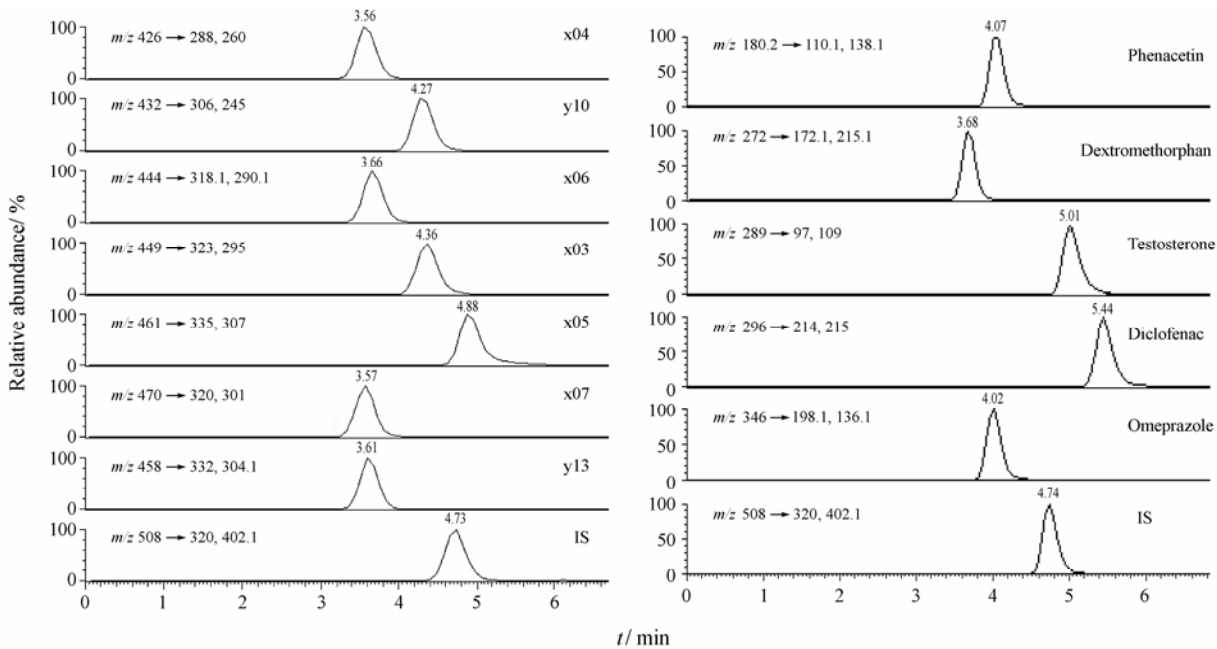


Figure 1 Representative chromatograms of target compounds and five CYP450 substrates. IS: Epothilone B

Table 1 Metabolism elimination and corresponding parameters of probe substrates in SD rat liver microsomes

CYP	Substrate	Remained concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					k_e/h^{-1}	$t_{1/2}/\text{h}$
		0 min	10 min	20 min	40 min	60 min		
1A2	Phenacetin	2.000	1.578	1.577	1.574	1.556	0.011 88	0.97
2D6	Dextromethorphan	2.000	1.382	1.184	0.891	0.706	0.026 22	0.44
2C19	Omeprazole	2.000	1.395	1.382	1.287	1.190	0.018 50	0.62
2C9	Diclofenac	2.000	1.697	1.603	1.442	1.347	0.011 06	1.04
3A2	Testosterone	2.000	0.634	0.318	0.115	ND	0.091 98	0.13

ND: Not detected

Table 2 Metabolism elimination and corresponding parameters of series tested compounds in SD rat liver microsomes

Compound	Remained concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					k_e/h^{-1}	$t_{1/2}/\text{h}$	$\text{CL}_{\text{int}}/\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
	0 min	10 min	20 min	40 min	60 min			
y13	2.000	2.066	1.838	1.781	1.500	0.001 63	7.08	15.6
x06	2.000	1.622	1.71	1.57	1.404	0.007 82	1.48	74.9
x07	2.000	1.768	1.671	1.563	1.46	0.008 96	1.29	85.8
x04	2.000	1.844	1.622	1.63	1.526	0.010 46	1.11	100.2
x05	2.000	1.664	1.522	1.351	1.282	0.013 63	0.85	130.8
x03	2.000	1.612	1.509	1.304	1.145	0.014 08	0.82	135.0
y10	2.000	0.069 8	0.063	0.028	0.032	0.172 44	0.07	1 660.5

浓度-时间曲线见图 2。

4.2 药代动力学数据处理 $C_{\max}$ 和 $T_{\max}$ 均为实测值, 其他参数由软件计算给出, 绝对生物利用度 $F = (D_{iv} \times AUC_{oral} / D_{oral} \times AUC_{iv}) \times 100\%$, 结果见表 3。

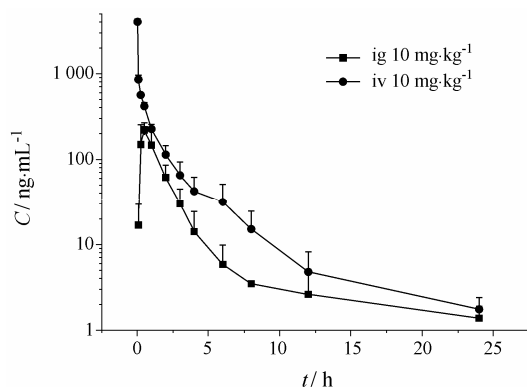


Figure 2 Mean plasma concentration-time curve of compound y13 in male SD rats ($n = 3$) after single ig and iv administration ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) of compound y13

Table 3 Pharmacokinetic parameters of rats after single ig and iv administration of compound y13 to male SD rats ($n = 3$)

Parameter	ig	iv
$T_{\max} / \text{h}$	0.7 ± 0.3	0.02 ± 0
$C_{\max} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	230.4 ± 40.3	$4\,022.9 \pm 369.9$
$AUC_{0-t} / \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	391.7 ± 95.6	$1\,112.8 \pm 191.8$
$AUMC_{0-t} / \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$1\,068.4 \pm 498.8$	$2\,431.3 \pm 1\,030.1$
MRT_{0-t} / h	2.5 ± 0.5	2.1 ± 0.6
$t_{1/2} / \text{h}$	2.2 ± 1.5	2.7 ± 1.2
$F / \%$	17.6	

讨论

药动学的体内筛选和体外筛选是相辅相成的, 药动学的体内筛选可以对体外筛选的结果加以验证并帮助寻找更富有预见性的体外筛选模型; 而体外筛选模型可以通过高通量筛选对大量的候选化合物进行初筛, 对候选化合物的药动学特性做出初步的评价, 缩小体内筛选的范围。体外筛选的方法有: 体外吸收模型、体外转运模型、体外代谢模型、药酶诱导模型、药酶抑制模型。体内高通量筛选主要有以下两种方法: 盒式给药方案^[6]和样品混合方案。样品混合方案又包括等时间点混合法^[7]和同只动物样品混合法^[8]。

本实验选用代谢模型和等时间点样品混合的方

法, 建立了多个化合物合并检测的 LC-MS/MS 分析方法, 对化合物的药动学性质进行快速筛选。通过体外代谢稳定性研究, 结合化合物药效活性, 筛选出 3 个半衰期合理、清除率低的化合物进入体内筛选, 通过体内筛选, 筛选出两个化合物可以进一步开发。这种体内、体外结合的药动学筛选, 节约了成本, 缩短了研发的周期。由于本研究采用的是 SD 大鼠的肝微粒体, 所以测定结果与人体内的代谢可能存在一定的差异, 但是可以预测化合物在人体内的代谢趋势。有关化合物的吸收, 代谢酶的诱导和抑制尚需进一步研究。

References

- [1] Prentis RA, Lis Y, Walker SR. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985) [J]. Br J Clin Pharmacol, 1988, 25: 387-396.
- [2] Linpinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2000, 44: 235-249.
- [3] Xu SY, Bian RL, Chen X. Pharmacology Experimental Technology (药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 511-514.
- [4] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with Follin phenol reagent [J]. Biol Chem, 1951, 193: 256-275.
- [5] Obach RS. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes [J]. Drug Metab Dispos, 1999, 27: 1350-1359.
- [6] Berman J, Halm K, Adkison K, et al. Simultaneous pharmacokinetic screening of a mixture of compounds in the dog using API LC/MS/MS analysis for increased throughput [J]. J Med Chem, 1997, 40: 827-829.
- [7] Kuo BS, Van Noord T, Feng MR, et al. Sample pooling to expedite bioanalysis and pharmacokinetic research [J]. J Pharm Biomed, 1998, 16: 837-846.
- [8] Cox KA, Dunn-Meynell K, Korfmacher WA, et al. Novel *in vivo* procedure for rapid pharmacokinetic screening of discovery compounds in rats [J]. Drug Discov Today, 1999, 4: 232-237.